

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Bürd
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5: C12N 15/13, C12P 21/08 C12Q 1/68, C07K 15/28

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: (43) Internationales

WO 93/01288

A1

DE

Veröffentlichungsdatum:

21. Januar 1993 (21.01.93)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP92/01524

(22) Internationales Anmeldedatum:

6. Juli 1992 (06.07.92)

(74) Anwalt: MÜLLER-BORE & PARTNER; P.O. Box 26 02 47, D-8000 München 26 (DE).

(30) Prioritätsdaten:

P 41 22 599.6

G01N 33/53

8. Juli 1991 (08.07.91)

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE).

(71) Annelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUT-SCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIF-TUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-6900 Heidelberg (DE).

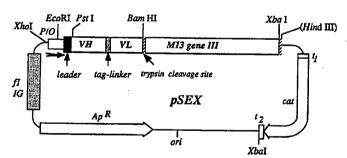
(72) Erfinder; und
(75) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BREITLING, Frank [DE/DE]; Am Schloßberg 49, D-6900 Heidelberg (DE). LITT-LE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von Briesen-Str. 10, D-6903 Neckargemünd-Dilsberg (DE). DÜBELS, Stefan (DE/DE); Quinckestr. 24, D-6900 Heidelberg (DE). BRAUNAGEL, Michael [DE/DE]; C 2, I, D-6800 Mannheim I (DE). KLEWINGHAUS, Iris [DE/DE]; Richard-Wagner-Str 40 D-6800 Mannheim (DE) Wagner-Str. 30, D-6800 Mannheim (DE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: PHAGEMIDE FOR SCREENING ANTIBODIES

(54) Bezeichnung: PHAGEMID ZUM SCREENEN VON ANTIKÖRPERN



(57) Abstract

A phagemide has been constructed that expresses an antibody merged to coliphage pIII protein. The phagemide is suitable for selecting specific antibodies from large gene banks with small quantities of antigen. The antibody-pIII gene can be strongly repressed, so that it allows antibody banks to be amplified without the danger of deletion mutants predominating. After induction, large quantities of the merged protein may be expressed.

(57) Zusammenfassung

Ein Phagemid wurde konstruiert, das einen an Coliphagen pHI Protein fusionierten Antikörper exprimiert. Das Phagemid eignet sich zur Selektion von spezifischen Antikörpern aus großen Genbanken unter Verwendung kleiner Mengen Antigen. Das Antikörper-pIII-Gen kann stark reprimiert werden, so daß Antikörper-Banken ohne Gefahr einer Dominanz von Deletionsmutanten amplifiziert werden können. Nach Induktion können große Mengen des fusionierten Proteins exprimiert werden.

> ATTORNEY DOCKET NUMBER: 7853-234-999 SERIAL NUMBER: 9/829,495 REFERENCE: BO

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kupftögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäs dem PCT veröffentlichen.

ΑT	Österreich	FI	Finaland	MN	Mongolei
	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU		GA	Gabon	MW	Malawi
88 · 8E	Barbarko Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina haso	GN	Guinca	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	CR	Griechenland	PL	Polen
		HU	Ungarn	RO	Rumilnien
BJ	Benin	12	Irland	RU	Russische Föderation
BR	Brasilen	iŤ	Italien	SD	Sudan
CA	Kanada			SE	Schweden
CA.	Zentrale Afrikansche Republik	JP	Japan	SN	Seneral
CC	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea		Soviet Union
CH	Schweiz	KR	Republik Korca	SU	
CI	Côte d'Ivoire	LI	Lechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	L.K	Sri Lunka	TG	Tugo
Csi	Tachuchoslowakci	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE•	Deutschland	MC	Munaco		
DK	Dänemark	MC	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

1

5

20

25

30

35

Phagemid zum Screenen von Antikörpern

Die vorliegende Erfindung betrifft Phagemide zur Selektion von spezifischen, aus großen Genbanken erhaltenen Antikörpern, die Herstellung dieser Phagemide und ihre Verwendung zur Selektion von spezifischen, aus großen Genbanken erhaltenen Antikörpern unter Verwendung geringer Mengen von Antigen.

Plasmid- und Phagen-Antikörper-Genbanken wurden in E.coli von PCR-amplifizierten Immunglobulin-Familien nach Immunisierung entwickelt. Rekombinante Antikörper gegen Immunogene wurden durch ELISA-Tests der Bakterienüberstände von isolierten Bakterienkolonien (Ward, E.S., Güssow, D., Griffiths, A.D., Jones, P.T. and Winter, G., "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli*, Nature (1989), 341, 544-546) oder durch Screenen von auf Nitrocellulose. übertragenen Plaques von Bakterienkolonien auf Reaktivität gegen radioaktiv markierte Immunogene (Huse, W.D., Sastry, L., Iverson, S.A., Kang, A.S., Alting-Mees, M., Burton, D.R., Benkovic, S.J. and Lerner, R.A., "Generation of a large combinatorial library of the immunoglobin repertoire in phage lambda, "Science (1989), 246, 1275-1281) selektiert. Zur Selektion jedoch von spezifischen Antikörpern von Genbanken willkürlich kombinierter leichter und schwerer Ketten von nicht-immunisierten Tieren, bei

denen kein Übergewicht von Antikörpern für ein betimmtes

1

25

30

35

Antigen vorliegt, ist ein Verfahren zum Screenen von Millionen von Antikörper-produzierenden Bakterien notwendig.

Ein möglicher Weg, einen großen Bereich von Antikörpern zu 5 screenen, liegt darin, rekombinante Antikörper an die Oberfläche von Bakterien oder Bakteriophagen zu binden, sodaß sie dann rasch durch an eine feste Phase gebundene Antigene selektiert werden können. Hinsichtlich der Schwierigkeiten, Proteine gezielt auf die Zelloberfläche von 10 Bakterien zu bringen, ist die M13-Familie von filamentösen Bakteriophagen wegen ihrer kleinen Größe und ihres relativ einfachen genetischen Aufbaus ein verlockender Kandidat (vgl. Übersichtsartikel von Webster, R.E. and Lopez, J., in "Virus Structure and Assembly", herausgegeben von S. 15 Casjens, veröffentlicht von Jones and Bartlett Inc.. Bosten/Portala Valley, USA, 1985; Day, L.A., Marzec, C.J., Reisberg, S.A. and Casadevall, A., "DNA packaging in filamentous bacteriophages", Ann. Rev. Biophys. Chem.

20 (1988), 17, 509-539).

Das Produkt von Gen III (pIII) ist ein relativ flexibles und zugängliches Molekül, das aus zwei funktionellen Domänen zusammengesetzt ist; einer amino-terminalen Domäne, die an den F-Pili männlicher Bakterien während der Infektion bindet, und einer carboxy-terminalen, innerhalb des Virion verborgenen Domäne, die für die Morphogenese wichtig ist. Peptide können zwischen den zwei Domänen von pIII (Smith, G.P., "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface", Science (1985), 228, 1315-1317) oder in der Nähe des N-Terminus (Parmley, S.F. and Smith, G.P., "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes", Gene (1988), 73, 305-318) ohne Zerstörung seiner Funktionen in Morphogenese und Infektion inseriert



1

5

10

15

35

6378-6382).

werden. Nach erheblicher Pionierarbeit über die Verwendung von pIII in fd Phagen zum Führen fremder Peptide, zeigten Parmely and Smith (1988, vorstehend angegeben), daß Peptidepitope, die am amino-terminalen Ende inseriert sind, Phagen an immobilisierte Antikörper binden können. In Folge dieser Arbeit war es möglich, Peptid-Genbanken zu entwickeln, die man auf Bindung an Liganden und Antikörpern screenen kann (Scott, J.K. and Smith, G.P. "Searching for peptide ligands with an epitope library", Science (1990), 249, 386-390; Devlin, J.J., Panganiban, L.C. and Devlin, P.E., "Random peptide libraries: A source of specific protein binding molecules", Science (1990), 249, 404-406; Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barrett, R.W. and Dower, W.J., "Peptides on phage, a vast library of peptides for identifying ligands", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990),87,

-3-

McCafferty, J., Griffith, A.D., Winter, G. and Chiswell, 20 D.J., "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains*, Nature (1990), 348, 552-554 berichteten über den Zusammenbau eines Antikörper-pIII-Fusionsproteins in einen fd-Phagen mit einem TetR-Gen nach Insertion der Antikörper-DNA in das 5'-Ende von Gen III. Der 25 Phage blieb infektiös und konnte durch Affinitäts-Chromatographie angereichert werden. Die Fusionsphagen zeigten sich jedoch hauptsächlich für relativ kleine Inserts als geeignet, wahrscheinlich weil die großen Inserts einen negativen Binfluß auf die Infektivität von pIII haben 30 (Parmlee and Smith, 1988, vorstehend angegeben). Daher besteht ein großes Risiko, daß in Phagen-Genbanken nach ihrer Amplifikation schnell Deletionsmutanten dominieren.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein wirksameres Mittel zum Screenen von Antikörper-Genbanken



WO 93/01288

1

Б

20

25

30

35

in Bakterien bereitzustellen.

Erfindungsgemäß wird dies durch ein Phagemid nach Anspruch 1 erreicht, das ein funktionelles Antikörper-pIII-Fusionsprotein exprimiert. Vorzugsweise ist der Antikörper ein Einzelketten-Antikörper.

-4-

DNA, die für ein Antikörper-pIII-Fusionsprotein, 10 vorzugsweise ein Einzelketten-Antikörper-pIII-Fusionsprotein, codiert, wurde in ein Phagemid eingebaut. Ein großer Vorteil des erfindungsgemäßen Phagemid-Systems gegenüber McCafferty et al. (vorstehend angegeben) liegt darin, daß es als Plasmid vermehrt werden kann und nicht 15 unter Selektionsdruck bezüglich der Entfernung von Antikörper-DNA steht, da die Expression des Fusionsproteins stark unterdrückt ist. Dies ist insbesondere während der Amplifikation der Antikörper-Genbanken wichtig, wenn schneller proliferierende Deletionsmutanten rasch dominant werden könnten. Die Phagemid DNA, die weniger als die Hälfte obiger Phagen DNA ausmacht, transformiert auch Bakterien effizienter. Darüberhinaus werden im Gegensatz zu obigem Phagensystem große Mengen der kleineren Phagemid DNA produziert und große Mengen von Antikörperprotein sind nach Induktion verfügbar, wodurch die Analyse stark erleichtert wird. ·

> Die Expression des Antikörper-pIII-Fusionsproteins, insbesondere des Einzelketten-Antikörper-pIII-Fusionsproteins, unter Verwendung des pSEX-Phagemids und seiner Verpackung in virale Partikel erleichtert die Entwicklung bakterieller Systeme zur Isolierung von Antikörpern hoher Affinität. Millionen Antikörper-produzierende Klone von Antiköper-Genbanken kann man jetzt rasch durch Bindung an immobilisierte Antigene screenen. Ein weiterer Vorteil gegenüber herkömmlichen Verfahren zum Screenen liegt darin, daß nur kleine Mengen Antigen benötigt werden, ein

-5-

1 wichtiger Faktor, wenn der Vorrat ines seltenen Proteins begrenzt ist. Dieses System ermöglicht auch, zufällig mutierte Antikörper zu screenen, um ihre Bindungs-Affinitäten zu erhöhen. Das Verfahren kann mehrfach 5 wiederholt werden, bis die gewünschte Spezifität erreicht ist. Es ist nun zum ersten Mal möglich, in großem Maßstab unterschiedliche Tests zum Screenen von verwandten Zellen und Organismen durchzuführen. Eine subtraktive Selektion. beispielsweise unter Verwendung von normalen und 10 neoplastischen Zellen, kann zur Identifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen verwendet werden. Das Phagemid-System erweist sich auch als äußerst hilfreich für die Untersuchung molekularer Wechselwirkungen. beispielsweise durch Selektion von Antikörpern, die eine 15 Liganden-Rezeptor-Bindung verhindern.

Ebenso erweist sich das erfindungsgemäße System als nützlich, andere Proteine oder Peptide an den Oberflächen von Phagemid-Viruspartikeln zu präsentieren. Hierfür ist die Antikörper-DNA nur durch die DNA des gewünschten Polypeptids zu ersetzen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

25

20

Beispiel 1

Konstruktion eines Phagemids (pSEX)

DNAs, die für einen Einzelketten-Antikörper (scAb) und pIII
codieren, wurden nach Insertion eines spezifischen Satzes
von Restriktionsstellen und einer Protease-sensitiven
Verbindungssequenz in die multiple Klonierungsstelle in pUC
l19 kloniert. Die Ab-DNA codierte für die variablen Domänen
der schweren und leichten Kette eines humanisierten Ab gegen
Hühnereiweiß-Lysozym, der von dem Anti-Lysozym Ab Dl.3
stammte (Amit et al., Science (1986), 233, 747-754;
Verhoeyen, M. et al., Science (1988), 239, 1534-1536). Diese
Domänen wurden über eine 18-Aminosäure-Linker-Sequenz

1 verbunden, die das Epitop des monoklonalen Ab YOL1/34 enthielt (Breitling, F. and Little, M., "Carboxy-terminal regions on the surface of tubulin and microtubules: Epitope locations of YOL1/34, DMlA and DMlB", J. Mol. Biol. (1986), 5 189. 367-370), wodurch der Ab identifiziert werden konnte. Zur Bereitstellung einer flexibleren Verbindung zu pIII, wurde das 3'-Ende der DNA für die leichte Kette durch Zusatz von Nucleotiden, die für die ersten sechs Aminosäuren der konstanten Domäne in der menschlichen Kappa-Kette codierten, 10 gefolgt von einer BamHI-Restrictionsstelle modifiziert. pIII DNA wurde von dem Bakteriophagen M13 amplifiziert, indem Primer entsprechend der 5'- und 3'-Enden des Gens III verwendet wurden. Die Ab-pIII-DNA wurde dann in einem Phagemid der pDS-Familie kloniert, das einen mit zwei 15 lac-Operatoren kombinierten Coliphagen-T7-Promotor enthielt (Bujard, H., Gentz, R., Lancer, M., Stüber, D., Müller, H.-M., Ibrahim, I., Häuptle, M.-T. and Dobberstein, B., "A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo", Methods 20 Enzymol. (1987), 155, 416-433; Lancer, M. and Bujard, H., "Promoters determine the efficiency of repressor action", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988), 85, 8973-8977; Müller, H.-M., Ph. D. thesis, Univ. Heidelberg, 1989). Schließlich wurde eine für die Leader-Sequenz des bakteriellen Enzyms 25 Pektatlyase codierende DNA an das 5'-Ende der Ab-DNA ligiert, wodurch das Phagemid pSEX (Fig. la) erhalten wurde. Die Leader-, Linker- und PCR-Primer-Sequenzen sind in Figur lb gezeigt. Eine alternative Linker-Sequenz (Fig. 1c) mit dem YOL1/34 Epitop am Ende des Linkers, die eine nützliche 30 Restriktionsstelle zur Insertion von Ab-Genbanken enthielt. wurde auch verwendet. Obwohl beide tag-Linker eine bedeutsame Menge saurer Reste enthielten, zeigten sie sich ohne Effekt auf die Herstellung von funktionellen scabs im Vergleich mit scabs, deren Linker nur aus den neutralen 35 Aminosäuren Glycin und Serin zusammengesetzt waren.

-7-

1

Beispiel 2

Expression eines Antikörper-pIII-Fusionsproteins

5

10

15

20

25

30

35

Zur Überprüfung, ob der fertige Phagemid-Vektor in der Lage war, das Fusionsprotein in voller Länge zu exprimieren, wurden 100 ,um IPTG einer sich in log-Phase befindlichen, mit pSEX transformierten E. coli-Kultur zugegeben. Die Kultur zeigte einen deutlichen Rückgang in ihrer Wachstumsrate, verglichen mit der Kontrolle, was auf eine bedeutsame Synthese eines Phagemid-codierten Proteins hinwies. In der Western-Blot-Analyse wurde das Antikörper-pIII-Konstrukt durch drei Antikörper identifiziert; einem monoklonalen Antikörper gegen einen Teil der Linker-Sequenz (EEGEFSEAR) und zwei Anti-Peptid-Kaninchenseren gegen N-terminale Sequenzen der schweren und leichten Ketten (QVQLQQSGGG bzw. DJOMTOSPSS). Es wanderte mit einem offensichtlichen Molekulargewicht von 93 kd (Fig. 2). Die große Größe des Fusionsproteins (vorausgesagt: Mr 68.100) ist höchstwahrscheinlich durch die pIII-Komponente (Mr 42.100) bedingt, die mit einem offensichtlichen Molekulargewicht von etwa 55.000 -70.000 kd wandert (Goldsmith, M.E. and Königsberg, W.H., "Adsorption protein of the bacteriophage fd: isolation, molecular properties and location in the virus", Biochemistry (1977), 16, 2868-2694). Partielle Proteolyse des Fusionsprotein wurde durch das Vorliegen einiger schwächerer Banden niedrigeren Molekulargewichts angezeigt,

Eine Zellfraktionierung zeigte, daß das Protein in den Cytoplasma und Membran-Fraktionen vorlag, nicht aber im Periplasma und dem Kulturüberstand (Fig. 2, Spuren 3-6) im Gegensatz zu der Antikörper-Komponente allein ohne pIII, die in das

die mit den drei Antikörpern identisch angefärbt wurden.

PCT/EP92/01524

1

5

10

15

20

Periplasma und das Medium sekretiert wurde (Daten nicht qezeigt). Dies war nicht überraschend, da pIII auf Phagenpartikeln aus der inneren bakteriellen Membran zusammengesetzt wird, ein Prozeß, der scheinbar nur von der C-terminalen Domäne abhängt. Deletionsmutanten von pIII ohne diese Domäne gelangen in das Periplasma, ohne an die cytoplasmatische Membran gebunden zu werden (Boeke, J.D. and Model, P., "A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl terminuns of bacteriophage fl gene III protein retained in the membrane", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982), 79, 5200-5204), und normale Phagenpartikel werden nicht zusammengesetzt (Crissman, J.W. and Smith, G.P., "Gene III protein of filamentous phages: evidence for a carboxy-terminal domain with a role in morphogenesis", Virology (1984), 132, 445-455). Die Anker-Sequenz ist wahrscheinlich eine hydrophobe Strecke von 23 Aminosäuren am Carboxy-Terminus (Davis, N.G., Boeke, S. and Model, P., "Fine structure of a membrane anchor domain", J. Mol. Biol. (1985), 181, 111-121).

Die Fähigkeit des Fusionsproteins, ein Antigen zu binden, wurde untersucht, indem die Triton-lösliche Fraktion über eine an Sepharose gebundene Lysozymsäule gegeben wurde.

Western Blots des ungebundenen Materials und der nach gründlichem Waschen und Eluieren mit 0,05 M Dimethylamin erhaltenen Fraktionen zeigten, daß das Fusionsprotein in

zurückgehalten wurde (Fig. 2, Spuren 7-12).

30

Beispiel 3

voller Länge tatsächlich spezifisch auf der Lysozymsäule

Verpackung des pSEX-Phagemids

35

Zur Bestimmung, ob der Phagemid-Expressionsvektor verpackt werden konnte, wurden pSEX-enthaltende E.coli mehrfach mit

-9-

1

5

10 .

dem Phagen fd infiziert. IPTG wurde nicht zugegeben, da gefunden wurde, daß es einen inhibitorischen Effekt auf das Verpacken eines Phagemids hat. Ähnliches wurde kürzlich von Bass et al., Proteins (1990), 8, 309-314 berichtet, der ein Phagemid konstruierte, das ein Fusionsprotein aus humanem Wachstumshormon und der C-terminalen Domäne von pIII exprimierte. Die Untersuchung der Ab-pIII-Produktion mit und ohne IPTG nach Zugabe des Phagen fd zeigte, daß der Phage allein in der Lage war, eine Expression zu induzieren (Fig 3). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß eines der Phagen-Gen-Produkte die Bindung des lac-Repressors an den Operator stört. Andererseits könnte die Bindung von Phagen-Proteinen an die Zwischengenregion die Topologie des Phagemid beeinflußen und die Freisetzung des lac-Repressors bewirken. Wie auch immer, wir haben gefunden, daß das Durchwandern der Zwischengenregion 103 Nukleotide zu der anderen Seite des bla-Gens keinen Effekt auf dieses Phänomen hat (Daten nicht gezeigt).

20

25

15

Agarose-Gelelektrophorese der von Viruspartikeln in das Medium abgegebenen DNA zeigt zusätzlich zu der Einzelstrang-DNA von fd eine größere Menge kleinerer DNA, die in der Größe mit einzelsträngigem pSEX vergleichbar war. Ein weiterer Beweis für eine Phagemid-Verpackung und der Produktion von infektiösen Partikeln wurde durch Infektion von E.coli mit den abgegebenen Virus-Partikeln erbracht. 10¹⁰ ml Amp^R E.coli Kolonien wurden im Vergleich zu 3x10⁹ pfu erhalten.

30

35

Zur Bestimmung, ob das verpackte Phagemid das Antikörper-pIII-Fusionsprotein eingebaut hatte, wurden 90 /ul Kulturüberstand, der 5x10⁸ verpackte, als Amp^R transduzierende Einheiten bestimmte Phagemide enthielt, mit einem tausend-fachen Überschuß an Wildtyp fd-Phage gemischt, 1

5

10

15

und über eine Säule immobilisierten Lysozyms gegeben. Nach gründlichem Waschen mit 10-fachem Badvolumen von PBS, 1 M NaCl bzw. 0,5 M NaCl in 0,1 M NaHCO₃ bei pH 8,3 wurden die Phagemid-Partikel mit 0,05 M Diethylamin eluiert. Das Eluat wurde mit 0,5 M NaH₂PO₄ neutralisiert und auf die Anzahl der Phagen und verpackten Phagemide getestet (Tabelle). Eine spezifische Anreicherung von bis zu 121-fach wurde erreicht, was den Einbau von funktionellen Antikörper-pIII-Konstrukten in die Phagemid-Partikel zeigte. Die Bindungseigenschaften der Phagemid-Partikel können weiter erhöht werden, indem eine pIII Deletionsmutante zum Verpacken verwendet wird. Dies garantiert, daß nur jene Phagemide, die für funktionelle Fusionsproteine codieren, verpackt werden und alle fünf pIII-Proteine auf einem Phagemid-Partikel mit Antikörper fusioniert werden.

Beschreibung der Figuren

20 Figur 1: Konstruktion von pSEX, einem
Phagemid zum Screenen von Antikörpern

VH und VL sind variable Domänen der schweren bzw. leichten Kette eines Anti-Lysozym-Ab.

25

30

(a) Konstruktion

Zur Bereitstellung der notwendigen Restriktionsstellen, wurden die Oligonukleotide

- 5'GCTGAATTCGGATCCATAGGGCCCTCTAGAGTCGAC3' und
- 5 'AATTGTCGACTCTAGAGGGCCCTATGGATCCGAATTCAGCTGCA3'
 - 5'-phosphoryliert, miteinander hybridisiert und in pUCl19 ligiert, der mit PstI und EcoRl geschnitten und dephosphoryliert war. Gegebenenfalls wurden zur

1

Schaffung einer Protease-sensitiven Sequenz die hybridisierten Oligonucleotide 5'GATCCAAAGATATCAGAGGGCC3' und 5'CTCTGATATCTTTG3' zwischen die BamHI- und ApaI-Stellen 5 des ersten Oligonucleotid-Satzes inseriert. scAB-DNA wurde dann zwischen die PstI- und BamHI-Stellen inseriert, gefolgt von der Ligierung der pIII-DNA über stumpfe Enden nach Spaltung des Phagemids mit ApaI und Behandlung mit T4-DNA-Polymerase zur Entfernung 3'-überhängender Enden. 10 pSEX wurde hergestellt, indem die multiple Klonierungsstelle von pUHE 24-2 mit dem nahe verwandten Phagemid pDS31-1 kombiniert wurde, das eine zusätzliche fl Zwischengenregion enthielt (Bujard et al., 1987, vorstehend angegeben; Müller, 1989, vorstehend angegeben). die pDS31-1-Sequenz erstreckt 15 sich von XhoI entgegen des Uhrzeigersinns bis zu einer HindIII-Stelle (in Klammern), die nach Ligierung über stumpfe Enden verloren wurde. pUHE24-2 ist im wesentlichen mit pDSG identisch (Bujard et al., 1987), bei dem ein Choli-Phage T7-Promotor mit zwei lac-Operatoren und einer 20 Ribosomen-Bindungsstelle kombiniert ist (PA1/04/03, Lancer and Bujard, 1988, vorstehend angegeben; Lanzer, 1988, vorstehend angegeben). Das erhaltene Phagemid wurde mit HindIII geschnitten und die 5'-überhängenden Enden wurden mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Nach einer weiteren Spaltung 25 mit PstI, wurde das PstI-HincII Ab-pIII-DNA-Fragment in das Phagemid inseriert. Schließlich wurde eine synthetische DNA, die für die Leader-Sequenz des Bakterienenzyms Pektatlyase und für die ersten vier Aminosäuren der schweren Kette codiert, zwischen die NcoI und PstI-Restriktionsstellen 80 inseriert. pUHE-Plasmide wurden in E.coli 71-18 mit dem Plasmid pDM1, das den lac-Repressor exprimiert, vermehrt, pUC-Plasmide wurden in DH5 vermehrt und das Antikörper-pIII-Fusionsprotein in JM101 exprimiert.

PCT/EP92/01524

1

- (b) Sequenz der Ribosomenbindungsstelle (RBS), der Leader-Sequenz der Pektatlyase, des tag-Linkers und der PCR-Primer für pIII.
- 5 Unterstrichene Aminosäuren geben das Epitop für YOL1/34 an. Die folgenden Aminosäuren in der Linker-Sequenz sind eine Fortführung der -Tubulin-Sequenz.
 - (c) Mögliche tag-Linker-Sequenz.

(+IPTG), 12: Eluat (-IPTG).

- Unterstrichene Aminosäuren geben das Epitop für YOL11/34 an. Die Aminosäuren des vorhergehenden Linkers sind eine Fortführung der Ab-Sequenz in die konstante Domäne.
- 15 Fig. 2: Induzierbarkeit, zelluläre Lokalisierung und
 Antigenbindung des Antikörper-pIII-Fusionsproteins,
 analysiert durch Gelelektrophorese auf 8 %
 Polyacrylamidgelen und Western Blott.
- Spuren 1 und 2: Gesamte Zellen nach 1 h Inkubation mit 100

 "uM IPTG (1) oder ohne IPTG (2).

 Spuren 3 6: Zellfraktionierung; 3: Kulturüberstand,

 4: periplasmatisch angereicherte Fraktion, 5: lösliche

 cytoplasmatische Fraktionierung, 6: 1 % Tritonextrakt.

 Spuren 7 12: Lysozym-Affinitätschromatographie des 1 %

 Tritonextraktes von induzierten und nicht-induzierten

 Zellen, 7: Ausfluß (+IPTG), 8: Ausfluß (-IPTG), 9: letzte

 Waschung (+IPTG), 10: letzte Waschung (-IPTG), 11: Eluat

30

Spuren 1 - 6 wurden angefärbt unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers YOL1/34 (Serotec, Oxford, U.K.) und Spuren 7 - 12 unter Verwendung eines Antiserums gegen die N-terminale Sequenz der leichten Kette.

-13-

1

35

Durchführung:

Antiseren gegen die schweren und leichten Ketten wurden durch subkutane Injektion von Kaninchen mit den 5 amino-terminalen Peptiden QVQLQQSGG(AC) bzw. DIOMTOSPSS(AC) erhalten, die an das Heamocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke gekoppelt waren. Zur Untersuchung der Expression des Fusionsproteins wurden pelletierte Bakterien von IPTG-induzierten Kulturen in 30 mM Tris/HCl, pH 8.0 10 Puffer resuspendiert, der 20 % Sucrose, 1 mM EDTA, 1 mg/ml Hühnerlysozym enthielt, und 10 min auf Eis inkubiert. Nach 1 minütiger Zentrifugation bei 15 000 g wurde der die periplasmatischen Proteine enthaltende Überstand gesammelt und das Pellet in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 beschallt. Die 15 lösliche cyctosolische Fraktion wurde nach 5 minütiger Zentrifugation bei 15 000 g abdekantiert und das resuspendierte Pellet in 1 % Triton X100 inkubiert, wodurch die membrangebundene Fraktion erhalten wurde. Sämliche Fraktionen wurden auf B-Lactamase-Aktivität gemäß Plückthun. 20 A. und Knowles, J.R.: "The consequences of stepwise deletions from the signal-processing site for B-lactamase". J.Biol. Chem. 262 (1987), 3951-3957 getestet, um die Effizienz des Fraktionierungsschrittes zu erfahren. Die tritonlösliche Fraktion wurde mit PBS 100-fach verdünnt. 25 bevor sie Affinitätssäulen zugegeben wurde. Zur Affinitäts-Chromatographie wurde Hühnerlysozym (Boehringer, Mannheim, FRG) mit Cyanogenbromid-aktivierter Sepharose (Pharmacia) gemäß den Anweisungen des Herstellers gekoppelt. Die Lysozym-Sepharose wurde 20 min bei Raumtemperatur mit 30 den Extrakten inkubiert und in Säulen gegossen, die nachfolgend mit 10 Bad-Volumina von PBS, 1M NaCl bzw. 0,5 M NaCl in 0,1 M NaHCO, bei pH 8,3 gewaschen wurden, bevor sie mit 0,05 M Diethylamin eluiert wurden. Sämtliche Fraktionen wurden mit Trichloressigsäure (Endkonzentration

20 %) präzipitiert und in SDS Polyacrylamidgelen aufgetrennt

(Laemmli, U.K.: "Cleavage of structural proteins

1

5

during the assembly of the head of the bacteriophage T4", Nature (1970), 227, 680-685). Western Blots wurden gemäß Towbin, H Steahelin, T. and Gordon, I.: "Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979), 76, 4350-4354, durchgeführt, indem zweite Antikörper, die an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt waren, mit Diaminobenziden als Substrat verwendet wurden.

Fig. 3: Gelelektrophorese von zirkulärem einzelsträngigen pSEX

15

10

Spur 1: fd, Spur 2: Kontroll-Phagemid pUHE31-1 mit fd, Spur 3: pSEX1 mit fd.

20

DNA von fd Virionen und verpackte Phagemid-Partikel wurden auf 0,8 % Agarosegele in lxTBE gemäß Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, "2. Auflage, herausgegeben in Cold Spring Harbor Laboratory (1989) gegeben und mit Ethidiumbromid angefärbt.

25

30

35

Durchführung:

Zur Herstellung verpackter Phagemide wurden pSEX1 enthaltende E. coli JM101 auf M9 Minimalmedium ausplattiert und 30 h bei 37°C inkubiert. 2 ml des gleichen Mediums wurden mit einer der Kolonien angeimpft und bei 37°C unter kräftiger Belüftung inkubiert, bis eine optische Dichte von etwa 0,2 bei 600 nm erreicht wurde. 0,5 ml LB-Medium und ein 10-facher Überschuß des Phagen fd wurden dann der Kultur zugegeben und diese weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Nachdem zweimal vorsichtig bei 15 000 g 5 min lang bei Raumtemperatur

-15-

1

5

zentrifugiert worden war, wurde der Überstand auf eine Endkonzentration von 4 % Polyethylenglykol (Serva PEG 6000) und 0,5 M NaCL eingestellt und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Die Phagemide wurden durch 20 minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 15 000 g sedimentiert und in 200 ul Tris-EDTA-Puffer, pH 7,5 suspendiert. Phagemid DNA wurde durch zehnminütiges Schütteln mit einem Volumen Phenol, gefolgt von einer Behandlung mit Chloroform-Isopropanol und Präzipitation mit Isopropanol präpariert (Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. Auflage, herausgegeben in Cold Spring Harbor Laboratory (1989)).

15 -

10

20

25

30

35

TABELLE

Spezifische Anreicherung von verpackten Phagemiden an einer Antigen-Affinitätssäule

L	1	-16
Anrelche- rungs- faktor	!	.121
Uberschyß // pfu/Amp	882	7,3
Gesamt	4,5×10 ¹¹ 882	2, 1x10 ⁶
Gesamt pfu Zahl	45	13
Plattiertes Gesamt pf Volumen (_{/ul)} Zahl	10_6	10-2
Gesamt	51 5,1×10 ⁸ 10 ⁻⁶	2,9x10 ⁵ 10 ⁻²
Amp ^r Kolonien Zahl	51	26
Plattiertes Volumen (_/ ul)	10-3	10_1
Gesamtes Volumen (ml)	100	1,1
	Aufgetragen 10	Elufert

ERSATZBLATT

1

- 17 -

5

10

15

20

30

Patentansprüche

 Phagemid mit einer für ein Fusionsprotein aus einem Antikörper und einem Coliphagen pIII-Protein codierenden DNA, dadurch gekennzeichent, daß das Fusionsprotein das Coliphagen pIII-Protein in voller Länge umfaßt.

- Phagemid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein Einzelketten-Antikörper ist.
- Phagemid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein zwischen dem Antikörper und dem Coliphagen pIII-Protein einen Protease-sensitiven Bereich enthält.
 - Phagemid nach einem der Ansprüche 1 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Struktur von Fig. 1 hat.
- 5. Verfahren zur Herstellung eines Phagemids nach Anspruch
 1, bei dem eine für einen Antikörper codierende DNA mit
 einer für ein Coliphagen pIII-Protein in voller Länge
 codierende DNA fusioniert und das erhaltene DNA Molekül
 in ein übliches Phagemid inseriert werden, wobei hierfür
 übliche DNA Rekombinationstechniken angewandt werden.
 - Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine für einen Einzelketten-Antikörper codierende DNA verwendet wird.
- 7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den für den Antikörper und das Coliphagen pIII-Protein codierenden DNA Sequenzen eine Proteasesensitive Sequenz eingefügt wird.

- 18 -

 Verwendung des Phagemids nach einem der Ansprüche 1 - 4 zur Selektion auf spezifische Antikörper aus Antikörper-Genbanken.

9. Verwendung des Phagemids nach einem der Ansprüche 1 - 4 zur Präsentation anderer Proteine oder Peptide auf der Oberfläche von Phagemid-Partikeln durch Austausch der den Antikörper codierenden DNA durch jene des gewünschten Proteins bzw. Peptids.

15

10

1

5

20

25

30

35

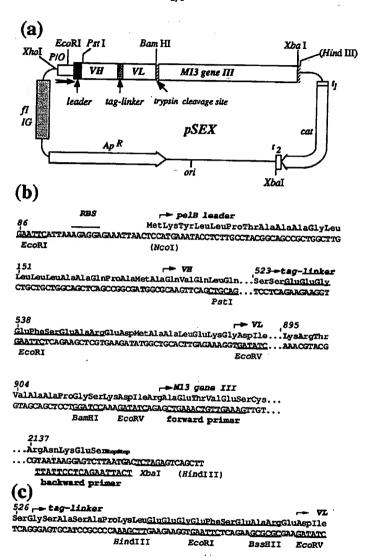
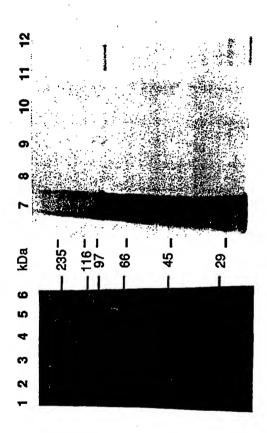


Fig.1

ig. 2



ERSATZBLATT

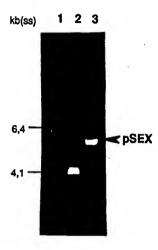


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 92/01524

A. CL	ASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
Int.	. Cl. 5: C12N 15/13; C12P 21/08; C12Q 1/68; C07K 15/28; G01N 33/53					
According	According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
	LDS SEARCHED					
	locumentation searched (classification system followed	by classification symbols)				
	Cl. 5: C12N; C07K; G01N; C12P					
	tion searched other than minimum documentation to th					
Electronic d	ate base consulted during the international search (nam	ne of data base and, where practicable, search	terms used)			
C. DOCU	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category*	Citation of document, with indication, where	appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.			
Х	NATURE Vol. 348, 6 December 1990, M JOURNALS LTD., LONDON, UK; pages 552 - 554	1,2,5,6, 8,9				
	J. MCCAFFERTY ET AL. 'Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains'					
Y	(cited in the application) see page 552, right column, line 1 - 1,3,5 page 554, right column, line 30; figure 1					
		-/ ·				
			-			
Further	documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.				
"A" document to be of p	Special categories of cited documents: "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand to be of particular relevance.					
"E" carlier do	E" earlier document but published on or after the international filing date "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be					
"O" document means	O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other combined with one or more other such documents, such combined with one or more other such documents, such combined with one or more other such documents, such combined with one or more other such documents, such combined with one or more other such documents, such combined with one or more other such documents, such combined with one or more other such documents.					
the priority date claimed "&" document member of the same patent family						
Date of the actual completion of the international search 24 SEPTEMBER 1992 (24.09.92) 12 OCTOBER 1992 (12.10.92)						
	lling address of the ISA/	12 OCTOBER 1992 (12.10.9	۷)			
Name and mailing address of the ISA/ EUROPEAN PATENT OFFICE Authorized officer						
acsimile No.		Telephone No.				
orm PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 92/01524

	ation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	Delementt-!- N
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NATURE Vol. 341, 12 October 1989, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK; pages 544 - 546 E.S. WARD ET AL. 'Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli' (cited in the application) see page 545, left column, line 23 - line 24; figure 2	1,3,5,7
X	PROC. NATL. ACAD SCI. Vol. 87, 1990, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US; pages 6378 - 6382 S.E. CWIRLA ET AL. 'Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands' (cited in the application) see page 6378, right column, line 1 - page 6380, right column, line 13; figure 1	1,9
X	SCIENCE Vol. 249, 27 July 1990, AAAS, WASHINGTON, DC, US; pages 386 - 390 J.K. SCOTT AND G.P. SMITH 'Searching for peptide ligands with an epitope library' (cited in the application) see page 389, right column, line 3 - line 33; figure 1	1,9
P,X	GENE Vol. 104, No. 2, 15 August 1991, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., US; pages 147 - 153 F. BREITLING ET AL. 'A surface expression vector for antibody screening' see page 149, right column, line 8 - page 152, left column, line 13; figures 1-4	1,9
P,X	WO, A, 9 209 690 (GENENTECH, INC.) 11 June 1992 see claims 1-52; figure 1	1,9

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. EP SA 61471

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.

The members are as contained in the European Patent Office EDP file on

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 24/09/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9209690	11-06-92	None	
	.==========		
		·	
•			
	•••		
			·•

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

FORM POOP

Internationales Aktenzeichen

		ELDUNGSGEGENSTANDS (d alia anzugeben)	<u> </u>
	oternationalen Patenta 5 C12N15/1 G01N33/5			C12Q1/68;	, C	07K15/28
II. RECHE	RCHIERTE SACHGE	BIETE				
		Rech	erchierter Mis	ndestprüfstoff ⁷		
Klassifikat	lionssytem		KI.	essifikationssymbole		
Int.Kl.	. 5	C12N ; C07	ίΚ ;	GO1N ;	C12P	
	4	Recherchierte nicht zum Minde unter die r	stprüfstoff geh recherchierten	örende Veröffentlichungen. Sachgebiete fallen ⁸	soweit diese	
III. EINSCI	ILAGIGE VEROFFE					
Art.º	Kennzeichnung der	Veröffentlichung 11 , soweit erfo	orderlich unter	Angabe der maßgeblichen	Telle ¹²	Betr. Anspruch Nr.13
x	JOURNAL	, 6. Dazember 199 S LTD., LONDON, U 552 - 554		ILLAN		1,2,5,6,
	J. MCCA filamen variable in der					
Y	siehe Seite 552, rechte Spalte, Zeile 1 - Seite 554, rechte Spalte, Zeile 30; Abbildung 1					1,3,5,7
					-/	
"A" Ver defi defi defi defi defi defi defi defi	röffentlichung, die den misert, aber nicht als be reers Dokument, das jed nach Annadé sakinin wir öffentlichung, die gesi iffelhaft erscheisen zu nichtungsdaum einer au nichtungsdaum einer au nicht veröffentlichung, die sich sem besonderen Grünn öffentlichung, die sich öffentlichung, die sor üffentlichung, die sor t, aber nach dem beans it worden ist	gegebenen Veröffentilchungen 10 allgemeinen Stand der Technik stonders bedeutstam muschen is och erst am oder nach dem inter urffentilch worden ist poet ist, einen Prioritätsanspurd ansten, oder durch die das Veröf- deren in Bedeutschen intereste ag- beigt werden ist (wie zusgeführt) auf eine stündliche Offenbarun rätlung oder nacher Maßnahme tem internationalen Anneddeds- pruchten Prioritätsdatum veröff-	st ma- h : : : : : : :	T' Späters Veröffentlichus meidestum oder dem ist und mit der Anmeis Verstündnis der der Berügen der der Hermannstellen verstündnis der der Berügendell X' Veröffentlichung von bete Erfindemg kann nich sehren betrachtet werdener oder menneren zu gerie in Verbindung geden Fachmann nahe dem Veröffentlichung, die f	legenden Theorie esonderer Bedeut it als neu oder an et warden esonderer Bedeut it als auf erfinder en, wenn die Ver ideren Veröffentli bracht wird und d iegend ist	angegeben ist ming die beanspruch- derinderischer Tätig- ung die beanspruch- ischer Tütigkeit be- Sfreutlichung mit chungen dieser Kate- lese Verbindung für
IV. BESCH					national on Da. 1	
Datum des A	Abschlüsses der Interna 24 . SEPTEMI			Absendedatum des Inter		i dilenoquena
International	le Recherchenbebürde EUROPAI	SCHES PATENTAMT		Unterschrift des bevolle HORNIG H	- 71)1	l benig

Permittat PCT/ISA/210 (Blatt 2) (James 1985)

Art *	LAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2) Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betz. Anspruch Nr.
		1 2 5 7
Y	NATURE Bd. 341, 12. Oktober 1989, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK; Seiten 544 – 546	1,3,5,7
	E.S. WARD ET AL. 'Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli'	
	in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 545, linke Spalte, Zeile 23 – Zeile 24; Abbildung 2	
x	PROC. NATL. ACAD SCI. Bd. 87, 1990, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US; Seiten 6378 - 6382 S.E. CWIRLA ET AL. 'Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying	1,9
	ligands' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 6378, rechte Spalte, Zeile 1 - Seite 6380, rechte Spalte, Zeile 13; Abbildung 1	
X	SCIENCE, Bd. 249, 27. Juli 1990, AAAS, WASHINGTON, DC, US; Seiten 386 - 390 J.K.SCOTT AND G.P.SMITH 'Searching for peptide ligands with an epitope library' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 389, rechte Spalte, Zeile 3 - Zeile 33; Abbildung 1	1,9
>,х	GENE Bd. 104, Nr. 2, 15. August 1991, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; Seiten 147 - 153 F. BREITLING ET AL. 'A surface expression vector for antibody screening' siehe Seite 149, rechte Spalte, Zeile 8 - Seite 152, linke Spalte, Zeile 13; Abbildungen 1-4	1-9
P.X	WO,A,9 209 690 (GENENTECH, INC.) 11. Juni 1992 siehe Ansprüche 1-52; Abbildung 1	1,9

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9201524 SA 61471

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben. Die Angaben über die Famisienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäinchen Patentamts am Diese Angaben diesen nur zur Unterrichtung und erfolgen abne Gewähr.

24/09/92

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Dutum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9209690	11-06-92	Keine	
•			

EPO FORM PORTS